文章编号:1673-1689(2006)06-0045-04

蜂毒肽与死亡素杂合肽(MT)在大肠杆菌中融合表达的研究

文良柱[1]， 张家骊[2]， 钱 坤[3]， 顾 林[1]， 徐寒梅[1]， 沈子龙*[1]
(1. 中国药科大学 生物技术中心,江苏 南京 210009; 2. 江南大学 生物工程学院,江苏 无锡 214036;3. 湖州师范学院 生命科学学院,浙江 湖州 313000)

摘 要: 人工合成的蜂毒肽与死亡素的杂合肽DNA序列,经聚合酶链式反应(PCR)扩增后得到带有BamHI和XhoI限制性酶切位点的序列.将此基因克隆至载体pET-32a,成功构建了重组质粒pET32a-MT.测序验证后转化大肠杆菌BL21(DE3),37 ℃ IPTG诱导,获得高效表达,融合蛋白经Ni柱亲和纯化后用肠激酶切下杂合肽,杯碟法检验酶切产物具有抑菌活性。

关键词: 蜂毒肽;死亡素;抑菌
中图分类号:R 978.1 **文献标识码**: A

Fusion Expressing of Melitin and Thanantin Heteropeptide(MT) in *E. coli*

WEN Liang-zhu[1], ZHANG Jia-li[2], QIAN Kun[3], GU Lin[1], XU Han-mei[1], SHEN Zi-long*[1]
(1. Research Center for Biotechnology, China Parmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 3. School of Life Science, Huzhou Normal College, Huzhou 313000, China)

Abstract: The cDNA sequences of melitin and thanatin heteropeptide was synthesized by PCR, then cloned into the fusion vector pET-32a and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). Furthermore the expected sequences were checked. Induced by IPTG at 37 ℃, the fusion protein was expressed. The protein was purified by HiTrap™ chelating Kit and then digested by rE kit, then the inhibition activity of the MT peptide was tested by disc methods, and which exhibit anctimicrobial activity.

Key words: melitin; thanatin; antimicrobial

蜂毒素(Melittin)是意大利蜂(*Apismellifera*)毒液的主要活性成分,由26个氨基酸组成,一级结构为GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ,它是由Habermanm等[1]首先从蜂毒中分离出来的。蜂毒素具抗菌、消炎、抗辐射、抗关节炎、抗肿瘤、抗艾滋病以及改善心血管功能等方面作用。但是蜂毒素有很强的溶血性,限制了其在临床上的使用,因此,对蜂毒素的结构进行改造,降低溶血性,就成为研究的一个目标。死亡素[2](thanatin),又称死亡肽,是在昆虫斑腹刺益蝽(*Podisus maculiventris*)中发现的由21个氨基酸残基组成的抗菌肽,结构简单,对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和某些真

收稿日期:2006-04-09; 修回日期:2006-06-05.
作者简介: 文良柱(1973-),男,安徽合肥人,微生物与生化药学博士研究生; * 为通讯作者.

万方数据

菌都有抑制作用，但是对金黄色葡萄球菌的抗性较低，对哺乳动物细胞不表现出溶血性[3]。作者将蜂毒素N端5～12位(VLKVLTTG)[1]氨基酸与死亡素4～21位氨基酸(KPVPIIYCNRRTGKCQRM)[2]氨基酸融合表达成杂合肽MT，希望不但能够抑制金黄色葡萄球菌，而且有死亡素广谱抗菌和无溶血性的特点。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌菌株DH5α、BL21(DE3)，质粒pET32-a均为作者所在实验室保存；供试金黄色葡萄球菌由中国科技大学微生物教研室提供。

1.2 酶试剂

限制性内切酶：MBI产品；Taq DNA聚合酶、dNTPs、DNA marker、5-溴-4-氯-3-吲哚半乳糖苷(X-gal)、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、agaroseVI、胶回收试剂盒(SK1131)和PCR引物：上海生工公司产品；pMD18-T和T_4连接酶：大连宝生物公司产品；肠激酶试剂盒(rE)为Novagen公司产品；HiTrap™ chelating Kit：Amersham Biosciences公司产品；其它为国内生产的分析纯产品。

1.3 MT基因的合成与克隆

1.3.1 MT基因的设计 根据蜂毒肽(5～12)VLKVLTTG与死亡素(4～21)KPVPIIYCNRRTGKCQRM的氨基酸序列和大肠杆菌偏爱密码子逆推出MT的cDNA序列，并设计出PCR的引物。

引物1：5'-GGATCCGACGACGACGACAAGGTGCTCAAGGTCCTCACTACGGG-3'

引物2：5'-GTTCCAGGAGTGATGCCCGTTCGGACAGGGCTATTAGATGACATTGGCA-3'

引物3：5'-CTATTAGATGACATTGGCATCCTGACCATTCACGGTCGCATACATTGAGCTC-3'

下划线序列为XhoI和BamHI酶切位点。

1.3.2 MT基因的合成 引物1和引物2互为模板，扩增后的产物经纯化后作为模板，再用引物1和引物3扩增出MT基因。PCR反应体系(25 μL)：引物浓度1 μmol/L，模板浓度为10 pmol/L，dNTPs40 μmol/L，$MgCl_2$ 10 mmol/L，Taq酶1U，PCR反应程序：94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，30个循环，72 ℃ 10 min。

1.3.3 MT基因的克隆和鉴定 质量分数2%琼脂糖电泳PCR产物，回收目的条带，按照生工SK1131胶回收试剂盒说明书回收目的片段，与T载体连接过夜，转化DH5α感受态细胞[5]，涂布在带有X-gal和IPTG的氨苄平板上，挑选白斑克隆，提取质粒后，分别用XhoII和BamHI单酶切验证为阳性克隆后，送上海生工测序。

1.4 重组表达载体的构建和鉴定

重组的T载体、pET32-a分别用XhoⅠ和BamHⅠ双酶切，电泳后切下目的片段，SK1131试剂盒回收，质粒片段和基因片段用T4连接酶4 ℃过夜连接。连接液转化感受态DH5α，挑取阳性克隆，用引物1和引物3进行PCR验证，PCR条件同上，将PCR验证正确的克隆，提取质粒，酶切验证正确后，送上海生工测序，命名为pET32-MT。将测序正确的质粒转化感受态BL21菌株。

1.5 重组子的表达与纯化

将已测序正确的阳性克隆按1%接种量接种至含Amp(100 μg/mL)LB培养基，37 ℃，200 r/min培养至A_{600}达到0.7～0.8后用IPTG(0.1 mmol/L)进行诱导，并在诱导后5 h取菌液进行SDS-PAGE电泳检测；同时离心收集菌体，洗涤后超声破碎，4 ℃，12 000 r/min离心15 min，收集上清，按HiTrap™ chelating Kit说明书进行纯化，收集目的峰。将所收集到的融合蛋白用截留相对分子质量为4 000的透析袋进行脱盐[6]，冷冻干燥后按每50 μg蛋白加入1 U重组肠激酶的比例在室温下进行酶切，酶切16 h和24 h后取样进行SDS-PAGE电泳检测[7]。

1.6 表达产物的活性鉴定和溶血性实验

杯碟法[8]检验表达产物的活性。供试金黄色葡萄球菌与大肠杆菌BL21分别作为G^+和G^-为试验敏感菌，从培养斜面上取一定量菌，在融化的固体培养基内摇匀后，铺板，小钢杯内加入待测定的样品，过夜培养。待测样品为融合蛋白经重组肠激酶(rE)酶切后的产物再经截留相对分子质量为4 000的滤膜超滤后的滤液，同时以用100 μg/mL的氨苄青霉素，50 μg/mL的卡那霉素以及无菌水为对照。取健康家兔血10 mL，按文献[9]方法加入酶切后的滤液，37 ℃恒温培养箱中放置3 h，观察结果。

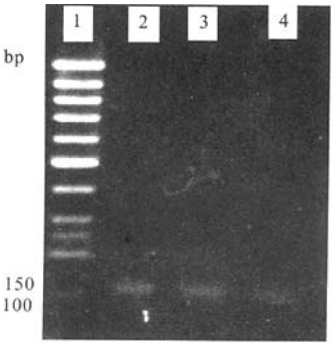
2 结果与讨论

2.1 MT基因的扩增

如图1所示，扩增出的MT基因(107 bp)大小正确，以引物1和引物3为验证引物，以重组表达质粒为模板，扩增出与目的片段大小相同的条带。将PCR产物纯化后与pMD-18T载体连接后转化挑取

万方数据

的阳性克隆送生工测序,序列正确。作者使用的 DNA Marker 最小为 50 bp,电泳后染色观察时,往往不太清除,可能是其相对分子质量较小,容易扩散所致,所以 EB 染色时间不能太长。



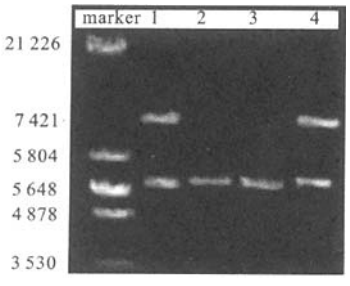
1. GeneRuler 50bp DNA Marker. 2 MT(引物 1、2、3 扩增结果). 3～4. 以引物 1、3 为模板,两个重组质粒 *pET32-MT* 为模板扩增结果.

图 1　MT 序列 PCR 扩增结果

Fig. 1　Electrophoresis analysis of MT PCR results

2.2　表达载体的构建

将测序正确的 T 载体,用 XhoI 和 BamHI 双酶切后回收的小片段与使用同样酶切的 pET-32a 质粒连接后转化感受态 BL21 菌株,挑取阳性克隆分别做 XhoI, BamHI 和 Hind III 单酶切,结果如图 2 所示,XhoI, BamHI 可以切开质粒而 Hind III 不能切开质粒,说明载体上有外源序列插入,将质粒送生工测序,结果表明序列正确。质粒命名为 pET32-MT。重组质粒由于其相对分子质量较大,而插入片段较小,需要高浓度的质粒双酶切才能显示切下来的小片段,而且电泳后小片段插入序列拖尾现象严重。



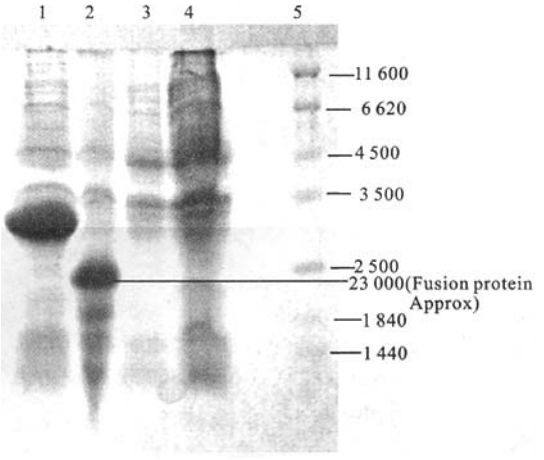
Marker λDNA/EcoRI; 1. 重组质粒; 2,3,4. 重组质粒分别为 XhoI, BamHI 和 Hind III 单酶切结果

图 2　重组表达质粒 pET32-MT 的酶切验证结果

Fig. 2　Electrophoresis analysis of restriction digest of recombinant plasmid

2.3　重组子的表达与纯化

IPTG(0.1 mmol/L)诱导 pET32a-MT 表达,结果(见图 3)表明,诱导后出现相对分子质量大约为22 000大小的蛋白,和预期的融合蛋白的大小一致,而这条带在空的 BL21、pET32a 转化的 BL21 以及诱导剂前都没有,凝胶扫描分析表明融合蛋白表达量可占菌体可溶性蛋白的 56%,可以说明重组质粒在大肠杆菌达到了高效表达。

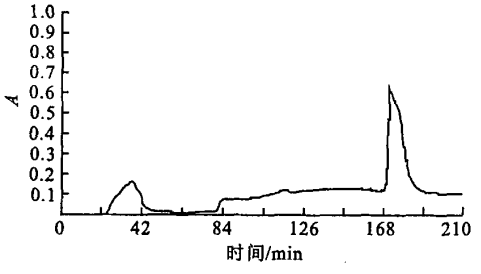


1. 空 pET-32a 质粒转化的 BL21 诱导 5 h; 2. 重组质粒转化的 BL21 诱导 5 h; 3. 重组质粒转化的 BL21 诱导 0 h; 4. BL21; 5. 蛋白质 Marker

图 3　重组质粒 pET32-MT 在大肠杆菌 BL21 中表达

Fig. 3　SDS-PAGE (12%) analysis of fusion protein expression induced by IPTG (0.1mM)

收集菌体超声破碎后,按 HiTrap™ chelating Kit 说明书进行纯化,如图 4 所示,收集目的峰(168 min～189 min)。



21～42 min 为杂质峰;168～189 min 为目的蛋白洗脱峰

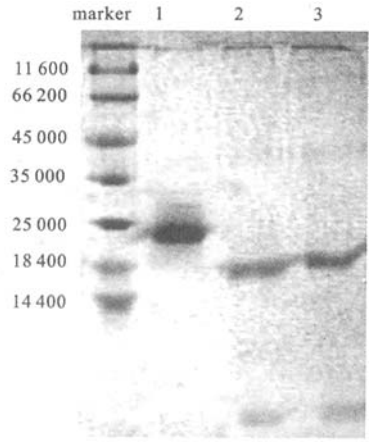
图 4　融合蛋白的 Ni 亲和层析洗脱图

Fig. 4　Elution curve of the fusion protein in His-Bind affinity chromatography

将融合蛋白和重组肠激酶按 50 μg∶1 U 的比例蛋白在室温下进行酶切,16 h 和 24 h 分别取样电泳检测,如图 5 所示,16 h 后融合蛋白已经被完全切开,切除 MT 多肽后的蛋白相对分子质量略大于 18 400,与理论值一致。MT 多肽条带较模糊,可能是其相对分子质量较小易扩散,浓度较低染色较浅

万方数据

所致。



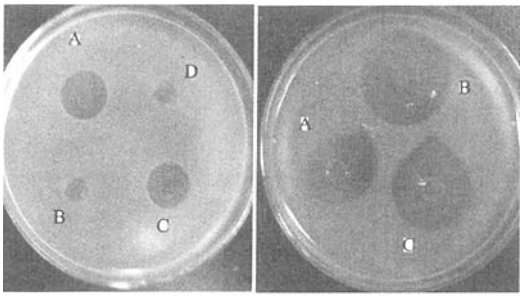
左为蛋白质 Marker；1. 融合蛋白；2 融合蛋白肠激酶酶切 16 h；3. 融合蛋白肠激酶酶切 24 h

图 5 融合蛋白肠激酶酶切电泳图

Fig. 5 SDS-PAGE(15%) analysis of fusion protein and its digested by rE

2.4 表达产物的活性鉴定

抑菌试验的结果见图 6，融合蛋白的肠激酶酶切产物对革兰氏阳性的金黄色葡萄球菌和革兰氏阴性的大肠杆菌都有抑制作用。融合蛋白酶切产物经过截留相对分子质量为4 000的滤膜超滤后可以除去大分子的片段，滤液中保留了小分子的杂合肽片段，可以认为酶切产物的抑菌性是由小分子杂合肽片段所产生。溶血实验结果表明，融合蛋白的酶切产物无溶血现象，与预期的一致。



(a) (b)

图(a)为融合蛋白酶切产物对金黄色葡萄球菌的抑菌实验，其中 A 为 100 μg/mL 氨苄青霉素；B 为水；C 为融合蛋白酶切产物；D 为 50 μg/mL 卡那霉素。

图(b)为融合蛋白酶切产物对大肠杆菌的抑菌实验，其中 A 为融合蛋白酶切产物；B 为 100 μg/mL 氨苄青霉素；C 为 50 μg/mL 卡那霉素。

图 6 融合蛋白肠激酶酶切产物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用

Fig. 6 Disc methods test of Fusion protein cut by rE with *E. coli* and *S. aureaus*

3 结 论

1)设计并合成了蜂毒肽与死亡素的杂合肽序列并插入到融合表达载体 pET-32a 中。

2)重组质粒 pET32－MT 转化 *E. coli* BL21(DE3)并实现高效表达，融合蛋白占菌体可溶性蛋白质量的 56%。

3)Ni 柱亲和纯化融合蛋白并用肠激酶进行酶切，酶切结果对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有抑制作用，也不表现出溶血性。

参考文献：

[1] Habermann E, Jentsch J. Sequence analysis of melittin from tryptic and peptic degradation products [J]. **Physiol Chem**, 1967, 348(1):37－50.

[2] Fehlbaum P, Bulet P, Chernysh S, et al. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides[J]. **Proc Natl Acad Sci SA**, 1996, 93 (3): 1221－1225.

[3] 蔡青松，张艳，翟朝阳. 新型抗菌肽分子的计算机辅助设计[J]. 华西医科大学报，2002，33(3)：447－449.

[4] Antonio Pellegrini, Roland von Fellenberg. Design of synthetic bactericidal peptides derived from the bactericidal domain P18y39 of aprotinin[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1999, 1433: 122－131.

[5] F 奥斯伯，R 布伦特，R E 金斯顿，等. 精编分子生物学实验指[M]. 颜子颖，王海林译. 北京：科学出版社，1998.

[6] 汪家政. 蛋白质技术手册[M]. 北京：科学出版社，2000.

[7] 徐小华，陈天豹，李珑，等. 一种改进的小分子多肽 SDS-PAGE 方法[J]. 福州大学学报，2001，29(3)：113－115.

[8] 徐叔云，卞如濂，陈修，等. 药理实验方法学[M]. 北京：人民卫生出版社，2002.

[9] 袁伯俊，王治乔. 新药临床前安全性评价与实践[M]. 北京：军事医学科学出版社，1997.

(责任编辑：朱 明)

万方数据